

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A.P

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



PCT/FR 99 / 0 1 8 1 3

REC'D 09 AUG 1999

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

EDKv

09/744488

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 MARS 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

24 JUL 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 09457 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75

DATE DE DÉPÔT

24 JUL 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen



demande initiale

☒ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

7/08/1997

ST98023

01 55 71 70 3

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

NOUVEAUX VECTEURS DERIVES DE BACULOVIRUS ET UTILISATION POUR LE TRANSFER D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES NERVEUSES.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 0 4 4 6 3 2 8 4

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RHONE-POULENC RORER S.A.

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☐ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre



5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☒ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

POULENC RORER S.A.
Poulen Ror

J SAVINA

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

980 9457

ST98023

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVEAUX VECTEURS DERIVES DE BACULOVIRUS ET UTILISATION POUR LE
TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES NERVEUSES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RHONE-POULENC RORER S.A.

20 avenue Raymond Aron

92160 ANTONY

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

SARKIS CHAMSY Jérémie

31 rue Bayen - 75017 PARIS (FRANCE)

MALLET Jacques

18 rue Charcot - 75013 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 23 juillet 1998

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir

J. SAVINA

L'invention concerne de nouveaux virus recombinants et leur utilisation pour le transfert de gènes dans les cellules du système nerveux. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant lesdits virus recombinants. Plus particulièrement la présente invention concerne de nouveaux vecteurs dérivés des
5 baculovirus et leur utilisation pour le traitement des maladies du système nerveux.

Les baculovirus sont des virus enveloppés à ADN bicaténaire circulaire spécifiques d'invertébrés. Leur prototype, AcNPV, a un génome de 133 kb. Ce vecteur est très largement utilisé comme vecteur d'expression de gènes eucaryotes en cellules d'insectes, à partir de deux promoteurs forts [polyédrique (Ph) et P10], (King
10 et Possee, The baculovirus expression system. London: Chapman&Hall, 1992.).

Les baculovirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue dans des cellules d'insectes (généralement Sf9 ou Sf21) entre le plasmide navette contenant le transgène sous contrôle d'un promoteur viral et le génome du baculovirus linéarisé au niveau du site de recombinaison. Un stock de baculovirus
15 peut alors être préparé par infection de cellules d'insectes (SF9 ou SF21) par le baculovirus recombinant. La production de protéine se fait par infection des cellules d'insecte avec le baculovirus: on récolte le milieu cellulaire et on extrait la protéine synthétisée *in vitro* dans les cellules d'insecte. Ces virus sont épisomaux (chez l'insecte), on peut y intégrer jusqu'à 100 kb d'ADN recombinant. Ainsi les
20 Baculovirus présentent de nombreux avantages liés à leur facilité de production (multiplication en cellules d'insectes, conditions de culture industrialisables, obtention de titres élevés), à leur capacité de clonage importante, et au fait qu'il présentent un faible risque de dissémination car ils ne sont pas répliatifs chez les mammifères. Ces vecteurs n'ont cependant pas été utilisés dans le domaine de la
25 thérapie génique, car d'une part et jusqu'à très récemment il était admis que ces virus n'infectaient pas les cellules de mammifères, et d'autre part la transfection de Baculovirus *in vivo* chez les mammifères n'a encore jamais été mise en évidence.

ORIGINAL

Hoffmann et al. (PNAS USA 92 (1995) 10099-10103) ont montré qu'un baculovirus recombinant contenant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur précoce de CMV est capable d'infecter et d'exprimer le transgène dans des hépatocytes avec une très bonne efficacité : humains (culture primaire, lignée Huh7 et
 5 HepG2) murins (culture primaire de lapin). Cependant ces auteurs n'ont pas observé d'expression significative du transgène dans toute une série de lignées provenant d'origines diverses, y compris du système nerveux (neuroblastome de souris Neuro-2a, astrocytome humain SW1088 et pheochromocytome de rat PC12).

Boyce F.M. et Bucher N.L.R. PNAS USA 93 2348-2352 (1996) ont obtenu
 10 une expression significative du gène LacZ placé sous contrôle d'un promoteur RSV dans la lignée HepG2 ainsi que dans les lignées 293 (rein humain), A549 (poumon humain) et PC12 (pheochromocytome de rat). Ils n'ont pas obtenu d'expression significative dans toutes les autres lignées testées, y compris K-562 (myelocyte humain) et HL-60 (promyelocyte humain).

15 Sandig V. et al. (Human Gene therapy 7 1937-1945 (1996)) ont utilisé un baculovirus recombinant RSV-LacZ pour l'infection d'hépatocytes humains et murins. Ils ont montré que le virus est sensible au complément et ne peut donc pas infecter *in vivo* le foie. Ils ont obtenu cependant une infection d'un morceau de foie humain perfusé *ex vivo* par le baculovirus, après élimination du sérum.

20 Plus récemment, Shoji et al. (J. Gen. Virol. 1997) ont utilisé un baculovirus recombinant contenant un gène sous contrôle du promoteur CAG (enhancer précoce du CMV et promoteur de la β -actine de poulet), et ont obtenu une expression significative dans différentes lignées cellulaires (HepG2, Huh7, CPK, Cos7, Hela, FS-L3 KATO-III). Une faible expression a été détectée dans les lignées RGM-1,
 25 PC12, IMR-32 et MT-2.

Barsoum et al (Human Gene Therapy, 8 2011-2018 (1997)) ont montré qu'il était possible de pseudotyper un baculovirus contenant une cassette d'expression de la

5 β -galactosidase sous contrôle du LTR de RSV. Ceci permet d'améliorer le potentiel de transduction de ces vecteurs, en améliorant l'infection des cellules infectables par le baculovirus non pseudotypé, et permet aussi d'infecter des cellules qui n'étaient pas infectables par le baculovirus non pseudotypé. Cependant ils n'ont pas testé l'infection de cellules neurales.

Ainsi jusqu'à présent aucun vecteur baculovirus n'a été utilisé pour le transfert de gènes *in vitro* ou *in vivo* dans les cellules du tissu nerveux. En effet, seule la lignée PC12, pouvant présenter dans des conditions particulières un phénotype "pseudo-neuronal" (phechromocytome de rat : système nerveux périphérique), s'est
10 révélée pouvoir être infectée par le baculovirus, cependant le niveau d'expression restait très faiblement supérieur à celui du contrôle. Enfin, aucune utilisation du baculovirus pour le transfert de gène *in vivo* chez les mammifères n'a été décrite jusqu'à présent.

La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des
15 baculovirus recombinants comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant préférentiellement pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux, d'administrer ces baculovirus recombinants *in vivo*, et que cette administration permet une expression stable et localisée du transgène *in vivo*, et en particulier dans le système nerveux. La présente invention
20 fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de transgènes d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans le système nerveux ou pour une application *ex vivo* pour le transfert de gènes dans des cultures de cellules du système nerveux destinées à être greffées. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement
25 avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives ou le traitement de maladies métaboliques nécessitant un traitement spécifique du système nerveux en raison de la faible accessibilité des agents thérapeutiques qui ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique.

Un premier objet de l'invention réside dans des baculovirus recombinants comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.

5 En particulier, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques.

Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

10 Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer
15 ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie.

20 Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, en particulier neurotrophiques pour le traitement des maladies neurodégénératives, des traumatismes ayant endommagé le
25 système nerveux, ou des dégénérescences rétinienne. Par exemple les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6 et leurs dérivés, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF et

leurs dérivés, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF et ses dérivés, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 leurs dérivés, et le TGF- β .

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut également citer les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes suicides : thymidine kinase, cytosine désaminase, etc.,

Les séquences d'acides nucléiques codant pour des produits d'intérêt thérapeutique au sens de la présente invention recouvrent également les gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des autres constituants de la cellule.

On peut ainsi citer de manière non limitative les gènes associés aux maladies du métabolisme des carbohydrates comme par exemple fructose-1-phosphate aldolase, fructose-1,6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase, α -1,4-glucosidase lysosomale, amylo-1,6-glucosidase, amylo-(1,4 : 1,6)-transglucosidase, phosphorylase musculaire, phosphofructokinase musculaire, phosphorylase-b-kinase, galactose-1-phosphate uridyl transférase, toutes les enzymes du complexe pyruvate déshydrogénase, pyruvate carboxylase, 2-oxoglutarate glyoxylase carboxylase, D-glycérate déshydrogénase.

On peut également citer :

- les gènes associés avec des maladies du métabolisme des amino-acides comme par exemple phénylalanine hydroxylase, dihydrobioptérine synthétase, tyrosine aminotransférase, tyrosinase, histidinase, fumarylacéto-acétase, glutathion synthétase, γ -glutamylcystéine synthétase, ornithine- δ -aminotransférase, carbamoylphosphate synthétase, ornithine carbamoyltransférase, argininosuccinate synthétase, argininosuccinate lyase, arginase, L-lysine déshydrogénase, L-lysine kétoglutarate réductase, valine transaminase, leucine isoleucine transaminase, décarboxylase des 2-céto-acides à chaîne ramifiée, isovaléryl-CoA déshydrogénase,

acyl-CoA déshydrogénase, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase, acétoacétyl-CoA 3-kéthiolasé, propionyl-CoA carboxylase, méthylmalonyl-CoA mutase, ATP:cobalamine adénosyltransférase, dihydrofolate réductase, méthylène tétrahydrofolate réductase, cystathionine β -synthétase, le complexe sarcosine 5 déshydrogénase, les protéines appartenant au système de clivage de la glycine, β -alanine transaminase, carnosinase sérique, homocarnosinase cérébrale.

- Les gènes associés avec des maladies du métabolisme des graisses et des acides gras, comme par exemple lipoprotéine lipase, apolipoprotéine C-II, apolipoprotéine E, d'autres apolipoprotéines, lécithine cholestérolacyltransférase, 10 récepteur des LDL, stérol hydroxylase du foie, « acide phytanique » α -hydroxylase.

- Les gènes associés avec des déficiences lysosomales, comme par exemple α -L-iduronidase lysosomale, iduronate sulfatase lysosomale, héparan N-sulfatase lysosomale, N-acétyl- α -D-glucosaminidase lysosomale, acétyl-CoA : α -glucosamine N-acétyltransférase lysosomale, N-acétyl- α -D-glucosamine 6-sulfatase 15 lysosomale, galactosamine 6-sulfate sulfatase lysosomale, β -galactosidase lysosomale, arylsulfatase B lysosomale, β -glucuronidase lysosomale, N-acétylglucosaminyl-phosphotransférase, α -D-mannosidase lysosomale, α -neuraminidase lysosomale, aspartylglycosaminidase lysosomale, α -L-fucosidase lysosomale, lipase acide lysosomale, céramidase acide lysosomale, sphingomyelinase 20 lysosomale, glucocérébrosidase lysosomale et galactocérébrosidase lysosomale, galactosylcéramidase lysosomale, arylsulfatase A lysosomale, α -galactosidase A, β -galactosidase acide lysosomale, chaîne α de l'hexosaminidase A lysosomale.

On peut également citer, de façon non restrictive, les gènes associés avec des maladies du métabolisme des stéroïdes et des lipides, les gènes associés avec des 25 maladies du métabolisme des purines et des pyrimidines, ainsi que les gènes associés à des maladies du métabolisme de la porphyrine et de l'hème.

La séquence d'acides nucléiques hétérologue peut être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308.

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée. Il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. Avantageusement, il s'agit d'un promoteur actif dans les cellules ou tissus nerveux, notamment d'un promoteur eucaryote. A cet égard, il peut s'agir par exemple d'un promoteur ubiquitaire, c'est-à-dire fonctionnel dans la majorité des types cellulaires. Encore plus préférentiellement, il s'agit donc d'un promoteur ubiquitaire eucaryote. Le promoteur peut être autologue, c'est-à-dire provenant de la même espèce que la cellule dans laquelle l'expression est recherchée ou xénogénique (provenant d'une autre espèce). On peut citer à titre d'exemples avantageux des promoteurs ubiquitaires eucaryotes des promoteurs forts tels que le promoteur du gène de la phosphoglycerate kinase 1 (PGK) ou d'autres promoteurs dirigeant l'expression des gènes du métabolisme cellulaire obligatoire (ces gènes sont dits "domestiques" ou "de ménage" et spécifient des protéines nécessaires à des fonctions communes à toutes les cellules). Il s'agit par exemple de gènes intervenant dans le cycle de Krebs, dans la respiration cellulaire ou encore dans la réplication ou la transcription d'autres gènes. On peut citer comme exemples particuliers de ce type de promoteurs, le promoteur

des gènes α 1-antitrypsine, β -actine, vimentine, aldolase A ou Efl α (facteur d'élongation).

Le promoteur utilisé dans le cadre de l'invention peut encore être un promoteur eucaryote de type neurospécifique. On peut citer à titre d'exemple le
 5 promoteur des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et, plus généralement, tous les promoteurs des enzymes de synthèse ou des transporteurs
 10 des neuromédiateurs ou tout autre promoteur de gènes dont l'expression est spécifique d'un type ou sous-type neuronal ou glial donné.

On peut également envisager l'utilisation de promoteurs viraux, tels que par exemple les promoteurs CMV (Cytomégalo virus), RSV (Rous Sarcoma Virus), TK (Thymidine Kinase), SV40 (Simian Virus) et LTR (Long Terminal Repeat) de RSV,
 15 de MLV (Murine Leukaemia Virus) ou de HIV (Human Immunodeficiency Virus).

Il est également envisageable d'utiliser des promoteurs chimériques tels que CAG (enhancer de CMV et promoteur de la β -actine de poulet), NRSE-PGK ou des promoteurs inductibles tels que les promoteurs inductibles par la tétracycline (Tet-On et Tet-Off), les promoteurs inductibles à l'ecdysone, ou encore d'autres promoteurs
 20 inductibles (RU486, 17 β -Oestradiol...) et notamment des promoteurs inductibles par le stress, tel que le stress thermique (hsp70)

En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

25 Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule

cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Le virus peut être utilisé aussi bien dans une approche *ex vivo* ou *in vivo*. Dans le cadre d'une thérapie génique applicable à l'homme, on peut envisager une approche *ex vivo* par greffe de cellules modifiées génétiquement par un baculovirus recombinant. Ces cellules peuvent être d'origines diverses: nerveuses (humaines ou non humaines). L'association de certains médicaments peut être envisagée en vue notamment de d'améliorer le maintien de la greffe ou l'expression du transgène (immunosuppresseurs, anti-complément...). On peut aussi envisager l'implantation de cellules génétiquement modifiées par un baculovirus recombinant après encapsidation dans un système inerte.

Les baculovirus selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier. En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un plasmide navette et le génome de *Autographa californica* dans les cellules SF9 et amplifié dans ces mêmes cellules selon la méthode décrite par Gruenwald S. et Heitz J., 1993 (Baculovirus expression vector system, procedure & method manual. Pharmingen Eds, San Diego, CA). Ensuite les baculovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire comme illustré dans les exemples.

Il est également possible de pseudotyper les baculovirus, c'est à dire de faire exprimer une protéine d'enveloppe autre que celles des baculovirus à la surface de ceux-ci, permettant ainsi de modifier le spectre d'hôte du virus. On peut ainsi utiliser des enveloppes qui permettent d'élargir le spectre d'hôtes à une très large variété de types cellulaires ou l'on peut au contraire envisager de restreindre le spectre d'hôtes à un type spécifique de cellules nerveuses. Parmi les protéines d'enveloppe utilisables on peut citer notamment : la glycoprotéine de VSV, la protéine d'enveloppe amphotrope de MLV. On peut également utiliser des protéines d'enveloppes qui

permettent d'améliorer spécifiquement l'entrée du virus dans les cellules neurales (CNS et/ou PNS) telles que la glycoprotéine de la rage, l'enveloppe de la rubéole, la glycoprotéine de HSV. Des variantes préférés de baculovirus recombinants selon l'invention sont des baculovirus pseudotypés par la glycoprotéine du virus de la rage (Rabies Virus) ou la glycoprotéine de VSV (Vesicular Stomatitis Virus).

Ces vecteurs recombinants peuvent être utilisés pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules des tissus nerveux *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

L'application *in vivo* pourra être faite notamment par injection stéréotaxique du baculovirus recombinant dans le système nerveux central (cerveau, moelle). A cet égard, il est possible d'utiliser l'association d'inhibiteurs du complément (CVF, sCRI, FUT175...) pour améliorer l'efficacité de la transfection. Il est également envisageable de réaliser l'administration du baculovirus, notamment au niveau du muscle, afin d'atteindre le système nerveux par transport rétrograde du baculovirus et/ou du produit thérapeutique. Dans ce dernier cas, l'injection sera avantageusement précédée par une inhibition du système du complément *in vivo*.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également toute utilisation d'un baculovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies du système nerveux. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces baculovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie de la sclérose en plaque ou d'autres maladies affectant la myélinisation, ainsi que les maladies affectant le métabolisme telles que les maladies lysosomiales.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants tels que décrits précédemment.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par différentes voies et notamment par voie intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intra-cérébrale, intra-ventriculaire, intra-médullaire, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un

5 véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système

10 nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

15 A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies du système nerveux, telles que par exemple les maladies neurodégénératives ou métaboliques, comprenant l'administration à un patient d'un baculovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration

20 stéréotaxique d'un baculovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les baculovirus recombinants selon l'invention

25 sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire d'insecte, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de

plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules neurales humaines infectée par ces baculovirus. Il peut s'agir en particulier de cellules gliales (astrocytaire, microgliale, oligodendrocyte, cellule de Schwann), épendymales, neurales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de greffes autologues, il peut s'agir d'astrocytes, de cellules embryonnaires, de cellules progénitrices nerveuses ou neuronales telles que les progéniteurs issus de télencéphale ou de mésencéphale humain, ces cellules peuvent être aisément obtenues à partir de biopsies. Il peut s'agir également de greffe hétérologue ou encore de xénogreffes issues de phéochromocytomes, ou de cellules embryonnaires ou d'astrocytes. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les baculovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des baculovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire une substance d'intérêt thérapeutique. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité

appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses de baculovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

5 Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

10 Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

 Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des
15 cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine
20 humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

 Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantagement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant
25 l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non

toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée dans un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies du système nerveux. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS, ou encore les maladies lysosomiales. Les baculovirus selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur faible immunogénicité, en raison de l'absence d'expression des protéines du baculovirus dans les cellules de mammifères.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

MATERIELS ET METHODES

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au

phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

EXEMPLES

Exemple 1 : construction de différents vecteurs baculovirus

1.1 - Construction et production du Baculovirus RSV-LacZ:

- 5 Le baculovirus recombinant RSV-LacZ a été obtenu par recombinaison homologue entre un plasmide navette et le génome de *Autographa californica* dans les cellules SF9 et amplifié dans ces mêmes cellules selon la méthode décrite par Gruenwald S. et Heitz J., 1993 (Baculovirus expression vector system, procedure & method manual. Pharmingen Eds, San Diego, CA).
- 10 Le plasmide navette a été élaboré par insertion dans le plasmide pVL1392 (Pharmingen, San Diego, CA) d'une cassette d'expression du gène de la *beta*-galactosidase nucléaire sous contrôle du LTR de RSV, et du signal de polyadénylation de SV40 en aval du gène LacZ. Cette cassette d'expression a été insérée dans le site multiple de clonage en orientation inverse par rapport au
- 15 promoteur de la polyhédrine contenu dans le plasmide pVL1392.

- Le virus est ensuite produit par amplification dans des cellules Sf9. Il a été concentré d'un facteur 100 par ultracentrifugation de 180 ml de surnageant (titré initialement à 3×10^7 pfu/ml) à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes dans un rotor SW 28, puis repris dans 2ml de PBS, ultracentrifugé à 25.000 t/min à 4°C pendant 90
- 20 minutes dans un rotor SW 41 dans un gradient de saccharose (10% à 60%, en PBS). La bande blanche correspondant aux particules virales purifiées a été prélevée et resuspendue dans du PBS et ultracentrifugée à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes. Le culot a été resuspendu dans 1,5 ml de PBS froid. Ce stock de virus concentré et purifié a été conservé à 4°C.

- 25 1.2 - Construction et production du Baculovirus CAG-LacZ:

Le baculovirus recombinant CAG-LacZ a été obtenu en utilisant le plasmide navette pAcYM1 (Matsuura et al, J. of Gen. Virol. 68 (1987) 1233-1250). Une cassette d'expression contenant le promoteur CAG contrôlant l'expression du gène LacZ a été insérée dans le plasmide navette. Le promoteur CAG est un promoteur composite consistant en un enhancer CMV IE, le promoteur de la *beta*-actine de poulet et le signal de polyadénylation de la *beta*-globine de lapin.

Le baculovirus recombinant a été obtenu par recombinaison homologue dans les cellules Sf9, puis amplifié dans ces cellules (selon le protocole de Matsuura et al., J. of Gen. Virol. 68 (1987) 1233-1250).

Le virus utilisé a été obtenu par amplification d'un aliquot du baculovirus recombinant dans les cellules Sf9. La solution virale est titrée à 1×10^9 pfu/ml. Le virus est ensuite concentré d'un facteur 100 et purifié dans les mêmes conditions que celles décrites pour le baculovirus RSV-LacZ.

Exemple 2 : test de l'infection *in vitro* de différentes cultures cellulaires

2.1 - Infection des cultures primaires d'astrocytes adultes:

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 4 puits. L'infection se fait à 37°C dans du milieu de culture sans sérum pendant 2 h environ. Elle a été faite avec des concentrations croissantes de virus recombinant. Après 24 h les cellules sont fixées (PFA 4%) et colorées par du X-Gal. Les contrôles non infectés ne présentent pas de cellule bleue.

L'observation des cultures à 24 et 48 heures après l'infection montre que le baculovirus recombinant est capable d'infecter des cellules d'une culture primaire d'astrocytes humains (télencéphale humain cultivé en bFGF) et d'exprimer le gène LacZ (observé par réaction X-Gal).

2.2 - Infection des cultures primaires de télencéphale embryonnaire humain:

Les cellules sont cultivées en milieu contenant du bFGF (milieu permettant de les maintenir dans un état de cellules progénitrices non ou très peu différenciées). L'infection a été faite dans le milieu de culture complet pendant 2 h. Les contrôles non infectés ne présentent pas de cellules bleues.

L'observation des cultures quatre jours après l'infection montre que le baculovirus recombinant est capable d'infecter des cellules progénitrices nerveuses humaines (télencéphale humain cultivé en bFGF) et d'exprimer le gène LacZ (observé par réaction X-Gal).

L'ensemble de ces résultats démontrent que les vecteurs recombinants dérivés des baculovirus sont capables d'infecter différents types de cultures primaires de cellules neurales in vitro et peuvent être ainsi utilisés comme vecteur de thérapie génique pour le transfert de gènes ex vivo.

Exemple 3 : Test in vivo

3.1 - Injection stéréotaxique dans le striatum de rat:

Des rats femelles adultes Sprague-Dowley ont été injectées avec 9 µl de virus RSV-LacZ concentré. L'injection a été faite par injection lente de 1 µl de virus (0,25 µl/min) dans trois sites d'injections avec 3 sous-sites pour chacun des sites.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma :

A: +1,8 , L: + 2,5 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

A: +0,6 , L: + 3,2 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

A: + 0,6 , L: +2 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

Après une semaine les rats sont fixés par perfusion intracardiale de PFA 4% en PBS et les cerveaux post-fixés pendant 24 h à 4°C dans du PFA 4%. Les cerveaux

sont ensuite cryoprotégés par immersion dans du saccharose 15% dans du PBS pendant 72h. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane froid (-50°C) et préservés à - 80°C.

3.2 - Histologie sur les cerveaux des rats injectés:

- 5 Les cerveaux sont coupés au niveau du striatum au cryostat (épaisseur de coupe: 20 μ m). Les coupes sont étudiées en immunohistochimie pour détecter la présence de β -galactosidase d'*E coli*. Les lames sont lavées en PBS, incubées en méthanol + H₂O₂ 0,3% pendant 1 heure, lavées en PBS, puis préincubées pendant 2 h avec du PBS + 10% SVF + 0,1% de Triton. Ensuite elles sont incubées toute la nuit
- 10 avec de l'anticorps anti- β -Gal (Cappel: 1:5000ème), lavées avec du PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire (Kit Vectastain Goat Anti-Rabbit). La révélation est faite en DAB + Nickel.

Un double-marquage fluorescent β -Gal + GFAP a été fait en utilisant un anticorps monoclonal anti- β -Gal (Promega) et un anticorps anti-GFAP polyclonal.

- 15 Très peu de cellules sont doublement marquées.

Un double-marquage fluorescent β -Gal + NeuN a été fait en utilisant un anticorps polyclonal anti- β -Gal (Cappel) et un anticorps anti-NeuN polyclonal. NeuN est un marqueur spécifique des neurones différenciés. On observe que la plupart des cellules sont doublement marquées.

- 20 On observe une transduction et un marquage plus prononcé des neurones à la périphérie du corps calleux ainsi que des cellules neuronales dans le striatum.

L'étude par immunohistochimie avec l'anticorps anti- β Gal démontre que le baculovirus recombinant permet l'infection et l'expression du transgène dans un grand nombre de cellules nerveuses. Elle montre aussi que le baculovirus recombinant est

25 insensible à l'inactivation par le complément dans le CNS.

REVENDICATIONS

1. Baculovirus recombinant comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.
- 5 2. Baculovirus selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
3. Baculovirus selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance,
10 les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.
4. Baculovirus selon la revendication 3, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6, les membres de la famille du CNTF tels que le
15 CNTF, l'axokine, le LIF, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et le TGF- β .
5. Baculovirus selon la revendication 3, caractérisé en ce que le gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique est le gène codant pour la β -glucuronidase.
- 20 6. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un baculovirus exprimant une protéine d'enveloppe autre que celle des baculovirus.
7. Baculovirus selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine d'enveloppe est la glycoprotéine du virus de la rage ou la glycoprotéine de VSV
25 (Vesicular Stomatitis Virus).

8. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend également des séquences promotrices permettant l'expression de la séquence d'acides nucléiques hétérologue.
9. Baculovirus selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séquence promotrice est choisie parmi les promoteurs des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).
10. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend également des séquences signal permettant d'induire une sécrétion du produit thérapeutique.
11. Utilisation d'un baculovirus recombinant comprenant dans son génome une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies du système nerveux.
12. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
13. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.

14. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5 et NT6, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et le TGF- β .
15. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que le gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique est le gène codant pour la β -glucuronidase
- 10 16. Population de cellules du système nerveux (e.g. cerveau, moelle épinière, cellules neurales, gliales, épendymales) infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10.
17. Implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10.
- 15 18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

ORIGINAL